

红褐斑腿蝗卵黄蛋白的分离纯化及性质分析

金建雅, 王世贵*, 徐彩娣, 黄淑娟

(杭州师范大学动物科学与技术杭州市重点实验室, 杭州 310036)

摘要: 用蒸馏水沉淀法、凝胶过滤、蛋白质电泳等方法提取纯化了红褐斑腿蝗 *Catantops pinguis* (Stål) 的卵黄蛋白, 并对其性质进行了分析。电泳结合不同的染色方法证明红褐斑腿蝗的卵黄蛋白为一种糖脂复合蛋白, 其分子量约为 548 kD, 由 7 个亚基组成, 亚基分子量分别为 147.3, 100.2, 95.9, 59.6, 53.6, 49.0 和 42.2 kD。卵黄蛋白经高效液相色谱分析检测到 17 种氨基酸和 NH_3 峰, 其中谷氨酸 (Glu) 百分含量最高, 达 13.46%, 天冬氨酸 (Asp)、亮氨酸 (Leu)、半胱氨酸 (Cys)、精氨酸 (Arg) 含量比较高, 脯氨酸 (Pro)、组氨酸 (His)、赖氨酸 (Lys) 含量较低。

关键词: 红褐斑腿蝗; 卵黄蛋白; 分离纯化; 性质

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2008)04-0372-07

Purification and characterization of vitellin from locust *Catantops pinguis* (Stål) (Orthoptera: Catantopidae)

JIN Jian-Ya, WANG Shi-Gui*, XU Cai-Di, HUANG Shu-Juan (Hangzhou Key Laboratory for Animal Science and Technology, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract: The vitellin was purified from eggs of the locust *Catantops pinguis* (Stål) using distilled water precipitation, gel filtration and gel electrophoresis. Its properties were also analyzed using polyacrylamide gel electrophoresis and different dyeing methods. The results indicated that the vitellin of *C. pinguis* was a kind of protein containing sugar and fat. The molecular weight of the vitellin was 548 kD, consisting of seven subunits with molecular weight of 147.3, 100.2, 95.9, 59.6, 53.6, 49.0 and 42.2 kD, respectively. From the vitellin, 17 kinds of amino acids and NH_3 peaks were detected by HPLC, among which the content of Glu was highest with 13.46% in the vitellin, and the contents of Asp, Leu, Cys and Arg were relatively high, while contents of Pro, His and Lys were low.

Key words: *Catantops pinguis*; vitellin; purification; property

卵黄蛋白 (vitellin, Vt) 是昆虫及其他节肢动物卵内的营养储备, 它的前体是来源于脂肪体的雌性特异血蛋白-卵黄原蛋白 (vitellogenin, Vg)。卵黄发生是一个异体合成过程, 包括卵黄蛋白的前体即卵黄原蛋白在脂肪体的合成以及卵巢的摄取过程。在大多数昆虫中, 卵黄原蛋白由脂肪体合成后, 通常是通过血淋巴转移到卵巢, 并通过被称为受体调节的内吞作用由卵母细胞吸收并在卵内沉积为卵黄蛋白, 为胚胎发育提供氨基酸、脂肪、碳水化合物、维生素等营养和功能性物质 (Byrne *et al.*, 1989; Falchuk and Montorzi, 2001)。卵黄蛋白与对应的卵黄原蛋白

在结构、生化及免疫特性等方面差别不大 (Kunkel and Nordin, 1985; Sappington and Raikhel, 1998), 它们的生化及分子生物学特征, 以及内在的调控机理在许多昆虫中得到了观察和研究 (Hagedorn and Kunkel, 1979; 龚和等, 1982; Kunkel and Nordin, 1985; Raikhel and Dhadialla, 1992; 龚和和李乾君, 1992; Hagedorn *et al.*, 1998; Sappington and Raikhel, 1998; 叶恭银等, 1998; Swevers *et al.*, 2005; 戴华国和衣维贤, 2006; Dong *et al.*, 2007)。在直翅目昆虫中, 主要是对飞蝗 *Locusta migratoria* (Chen *et al.*, 1978; Chinzei *et al.*, 1981; Reid and Chen, 1981; Petavy,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300042)

作者简介: 金建雅, 女, 1982 年生, 浙江人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理学, Tel.: 0571-28865680, E-mail: jinjianya@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: sgwang@mail.hz.zj.cn

收稿日期 Received: 2007-10-23; 接受日期 Accepted: 2008-02-19

1985, 1986; Chen and Hillen, 1987; 陈建新等, 2002)、沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* (Injeyan and Tobe, 1981a, 1981b)、迁移蚱蜢 *Melanoplus sanguinipes* (Hinks *et al.*, 1991)、家蟋蟀 *Acheta domesticus* (Chang and Bradley, 1983; Handley *et al.*, 1998) 等少数经济昆虫进行了研究。卵黄发生是昆虫生殖过程的关键步骤, 有研究表明昆虫卵黄蛋白的合成与转运受到激素的调控, 如飞蝗就是典型的以保幼激素为主调控卵黄蛋白合成的例子 (Wyatt, 1990), 保幼激素对飞蝗卵黄蛋白基因调控的分子作用机理已取得了不少进展 (Kidokoro *et al.*, 2006)。通过激素调控来影响昆虫的卵黄蛋白合成已成为防治害虫的潜在手段 (Minakuchi and Riddiford, 2006)。有关卵黄蛋白的结构及其合成与调控机理更是当前昆虫生理学的研究热点之一。

红褐斑腿蝗 *Catantops pinguis* (Stål) 是广布于温带-亚热带地区的一种直翅目昆虫, 分布区域包括非洲, 亚洲南部和东部, 马来亚群岛和菲律宾群岛, 及澳大利亚等, 国内从河北到海南都有分布, 常为害玉米、豆类及茶树等, 具有较强的耐寒能力, 浙江等地常见有越冬成虫 (王世贵和阿布里克木·古丽米热, 2006)。该种蝗虫具有极强的繁殖力, 但有关其卵黄蛋白的结构与性质还未见报道。本文以蒸馏水沉淀法结合离子交换层析技术, 从红褐斑腿蝗卵巢粗提物中分离纯化卵黄蛋白, 用电泳结合不同的染色方法以确定卵黄蛋白的性质, 并用高效液相色谱法对其游离氨基酸组成进行了分析, 为深入研究其卵黄蛋白的合成与调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

红褐斑腿蝗均采自杭州龙井茶园。采集时间为红褐斑腿蝗的繁盛季节 (5 - 8 月), 在实验室控光 (光周期 14 L: 10 D, 光照强度 > 1 000 lx)、控温 (28℃ ± 1℃)、控湿 (RH 60% ~ 80%) 的养虫室或智能人工气候箱内, 用人工培育的小麦苗 (10 日苗期) 作为供试饲料饲养。待蝗虫适应后选取健康成虫进行实验。

1.2 仪器和试剂

试验所用主要仪器有 Mettler 公司 AE204E 型电子分析天平、美国 Ultra-Lum 公司凝胶成像分析仪。EPS601 型电泳仪配 Hoefer SE600 垂直电泳槽、蛋白质快速层析仪 (ÄCTA FPLC)、HiPrep 16/100

Sepharose™ G100 凝胶过滤柱为安玛西亚公司出品; 高效液相色谱仪 600E 型为 Waters 公司出品。

PAGE 的高分子量标准蛋白购自安玛西亚公司。AccQ·Fluor™ Reagent Kit 衍生试剂、标样、AccQ·TagA 液购自 Waters 公司, 考马斯亮蓝 R250、十二烷基硫酸钠 (SDS)、四甲基乙二胺 (TEMED)、Tris、甘氨酸 (Gly)、丙烯酰胺、N, N'-甲叉双丙烯酰胺、SDS-PAGE 的标准蛋白、玻璃纤维、苏丹黑 B 和希夫试剂购自上海生工, 其他试剂为国产生化或分析纯试剂。

1.3 卵黄蛋白的制备与纯化

用眼科小剪刀剪开红褐斑腿蝗雌虫腹部, 取出卵巢并用双蒸水冲洗, 滤纸吸干后, 称重。按 1:20 (质量 g/体积 mL) 加入 0.4 mol/L NaCl 溶液进行匀浆, 匀浆液在 4℃ 下 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液在 4℃ 下用玻璃纤维过滤除去脂层。

按龚和等 (1982) 的蒸馏水沉淀法初步分离得到卵黄蛋白。卵巢匀浆液上清按 1:8 的比例加入预冷的双蒸水, 于 4℃ 静置过夜, 使卵黄蛋白逐渐在低离子强度条件下沉淀下来; 再于 5 000 r/min, 4℃ 下离心 20 min, 弃上清液。沉淀物再溶于少量 0.4 mol/L NaCl 溶液, 低速离心除去不溶物, 所得上清液再按 1:8 比例加入预冷的双蒸水, 使卵黄蛋白沉淀下来, 重复 3 次, 可获得较高纯度的卵黄蛋白。

将双蒸水沉淀后获得的卵黄蛋白盐溶液用 HiPrep 16/100 Sepharose™ G100 凝胶柱过滤, 过程如下: 将卵粗提物移入透析袋内, 盐溶液中 4℃ 透析, 用 10 倍柱体积的 0.4 mol/L 的氯化钠溶液平衡, 使 pH 和离子强度与层析柱中一致, 上样 1 mL, PBS 洗脱 (流速为 5 mL/20 min), 5 mL/tube 收集洗脱液, 在 280 nm 处检测光吸收值, 洗脱液用 Fraction-900 自动收集器进行收集, 收集具有最大吸收值的洗脱液, 冷冻干燥浓缩后作为分析用样品, 于 -20℃ 保存备用。

1.4 卵黄蛋白的存在检验

1.4.1 卵黄蛋白抗血清的制备: 将提纯的卵黄蛋白用 0.4 mol/L NaCl 溶液溶解并稀释至浓度为 5 mg/mL, 首次与等量弗氏完全佐剂混合, 注射于雄兔 (2 ~ 3 kg) 腹股沟, 注射量 2 mL; 以后每周注射一次, 第 2、3 次采用背部多点注射, 注射量 2 mL (溶剂换成不完全佐剂), 第 4、5 次耳静脉注射 1 mL Vt (不含佐剂), 最后一次注射后 7 天耳静脉采血, 分离血清, 用 1% 的琼脂糖双向扩散法 (Izumi *et al.*, 1994) 测定效价, 效价达 1:32 以上后隔一周颈动脉放血。最后分离得效价为 1:64。然后将血清与雄性褐飞虱成虫匀浆液混合, 37℃ 水浴保温 1 h, 室温下 850 g 离

心 15 min, 取上清液得卵黄蛋白的特异性抗血清, 置 -80°C 下备用。

1.4.2 卵黄蛋白的免疫学特性分析: 采用双向免疫扩散法(李成文, 1992) 分别将红褐斑腿蝗雌成虫、雄成虫、卵黄匀浆稀释液, 加入 1% 琼脂糖凝胶板的样品孔中(孔径 3 mm); 样品孔排列呈梅花型, 每孔加样量 20 μL ; 中心孔(孔径 3 mm) 加入 25 μL 红褐斑腿蝗卵黄蛋白抗血清。加样后, 将琼脂糖凝胶板放入电热恒温培养箱内, 37°C 保湿扩散 36 h, 取出后用 0.9% 灭菌生理盐水漂洗两次, 每次 5 h, 干燥后用 0.25% 考马斯亮蓝 R250 染色后根据染色情况判断结果。实验重复 3 次。

1.5 卵黄蛋白的电泳特性与定性分析

1.5.1 电泳: 在电泳过程中为防止卵黄蛋白的降解, 在配制卵黄蛋白的时候加入了酶抑制剂 PMSF, 使酶抑制剂的终浓度为 2 mmol/L。

电泳参照何忠效和张树政(1999) 的方法并稍加改进。聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳(PAGE) 检验卵黄蛋白样品的纯度及分子量大小, 浓缩胶为 4%, 稳压 150 V, 分离胶浓度梯度为 4% ~ 22%, 稳压 200 V。电极上液和电极下液同为 pH8.3 的 Tris-Gly 缓冲液(28.52 g Gly + 6.06 g Tris, 定容至 1 000 mL, pH8.3, 用时稀释 10 倍)。

普通聚丙烯酰胺电泳(PAGE) 检测卵黄蛋白的糖脂成分, 浓缩胶浓度为 4%, 稳压 150 V, 分离胶浓度为 7.5%, 稳压 200 V。缓冲液体系为 pH8.3 的 Tris-Gly 缓冲液。

SDS-PAGE 分析卵黄蛋白亚基组成及各亚基分子量, 浓缩胶为 4%, 稳压 150 V; 分离胶为 7.5%, 稳压 200 V。电极上液为 pH8.3 的 Tris-Gly 缓冲液(28.8 g 甘氨酸 + 6 g Tris + 10 mL 10% SDS 溶液, 用双蒸水定容至 1 000 mL), 电极下液与此相同但不含 SDS。样品缓冲液为 1.6 mL 浓缩胶缓冲液 + 4 mL 10% SDS + 1 mL β -巯基乙醇 + 2.5 mL 87% 甘油 + 0.1 mg 溴酚蓝, 用双蒸水稀释至 20 mL, 4°C 保存。

1.5.2 蛋白染色: 蛋白质染色用考马斯亮蓝 R250 染色: 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳(PAGE)、SDS-PAGE 后用 20% 三氯乙酸固定 45 min, 用 0.1% 的考马斯亮蓝 R250 染色液(0.2 g 考马斯亮蓝 R250 溶于 250 mL 脱色液中) 染色 1 h, 最后再用脱色液(250 mL 95% 乙醇 + 80 mL 冰醋酸, 再用蒸馏水定容至 1 000 mL) 脱色直到背景变白, 拍照并用凝胶分析系统对图像进行分析处理。

脂蛋白染色采用苏丹黑预染法(莽克强等,

1975): 聚丙烯酰胺凝胶电泳后的凝胶置于苏丹黑 B 溶液(苏丹黑 B 0.2 g, 乙醇 60 mL, 乙酸 10 mL, 蒸馏水 30 mL) 中染色 15 min, 置于脱色液(250 mL 95% 乙醇 + 80 mL 冰醋酸, 再用蒸馏水定容至 1 000 mL) 中脱色, 直到背景清晰并拍照。

糖蛋白染色采用过碘酸-希夫试剂染色法(PAS 染色法)(莽克强等, 1975): 凝胶在溶液 1(过碘酸钠 2.5 g, 蒸馏水 86 mL, 冰乙酸 10 mL, 浓盐酸 2.5 mL, 三氯乙酸 1 g) 中浸 8 h, 然后用溶液 2(冰乙酸 10 mL, 三氯乙酸 1 g, 蒸馏水 90 mL) 洗 3 ~ 4 次, 再用溶液 3(希夫试剂) 染色 16 h, 最后用溶液 4(硫酸钾 1 g, 浓盐酸 20 mL, 蒸馏水 980 mL) 脱色、拍照。

溶液 3 的配制方法: 将 1 g 碱性品红溶于 200 mL 沸水中, 摇晃 5 min 后冷却至 50°C 过滤, 向滤液中加入 20 mL 1 mol/L HCl 冷却至 25°C , 加 1 g 焦亚硫酸钠, 将此溶液在暗处放置 14 ~ 24 h, 加 2 g 活性炭振荡 1 min, 过滤, 滤液为无色透明, 4°C 下保存于棕色瓶中备用。

1.6 高效液相色谱

卵黄蛋白水解: 准确称取 1 mg 的蛋白质样品于安瓿管中, 加入 1 mL 6 mol/L HCl 溶液真空烧结封口, 移入 110°C 恒温箱中加热 24 h, 以不加卵黄蛋白样品的 6 mol/L HCl 溶液为空白对照。水解完成后用微量注射器吸取 20 μL 水解液于 1 mL 样品管中, 真空干燥后加入 20 mmol/L 的盐酸溶液 20 μL 旋涡混匀备用。

样品的衍生和测定: 取上述水解样品, 加入 60 μL AccQ·Fluor 硼酸缓冲液旋涡混匀再加入 20 μL AccQ·FluorTM Reagent Kit 衍生剂旋涡混匀, 静置 1 min, 于 55°C 烘箱加热 10 min, 过 0.45 μm 滤膜后高效液相色谱(HPLC) 上机分析: 流速: 1 mL/min, 进样量: 10 μL , 柱温 37°C 。标样为含有 17 种氨基酸的校正标样(40 μL Waters 水解氨基酸标样 + 960 μL Mili-Q 纯水)。流动相: 稀释过的 AccQ·TagA 液、乙腈、超纯水。以非水解卵黄蛋白、空白管作对照。

2 结果与分析

2.1 卵黄蛋白的分离纯化

红褐斑腿蝗卵黄蛋白粗提物用 HiPrep 16/100 SepharoseTM G100 凝胶过滤, PBS 洗脱, 在 280 nm 处检测光吸收值, 收集具有最大吸收峰的洗脱液, 洗脱曲线见图 1。

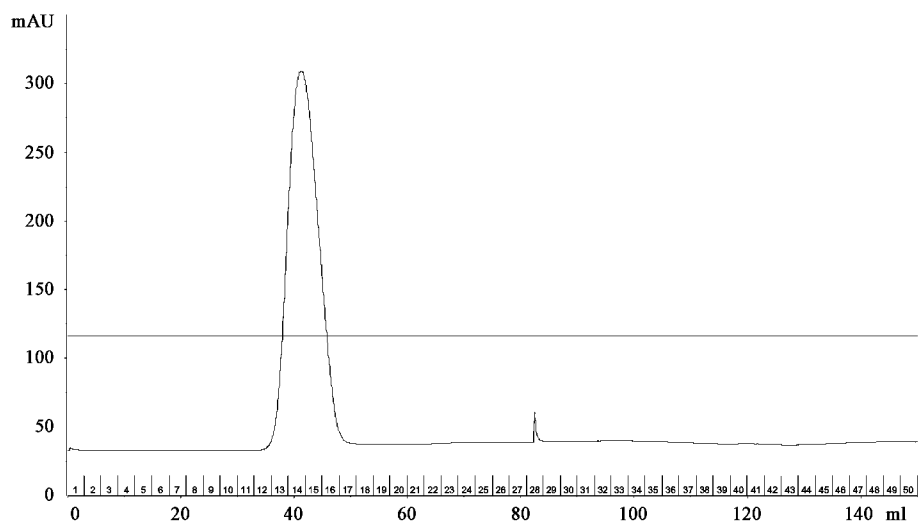


图 1 红褐斑腿蝗卵粗提物经 Sepharose™ G100 后的洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile from Sepharose™ G100 gel filtration column of the egg crude extract of *Catantops pinguis*

2.2 卵黄蛋白的存在检验

将红褐斑腿蝗雌、雄成虫血淋巴稀释液及分离纯化的卵黄蛋白，与红褐斑腿蝗卵黄蛋白抗血清进行双向免疫扩散实验，染色后结果见图 2。从染色结果可以看出：红褐斑腿蝗卵黄蛋白抗血清与雌成虫血淋巴、卵黄蛋白提取物均有免疫沉淀反应，有抗原同源性，说明卵黄蛋白在雌成虫体内、卵内均存在；而与雄成虫血淋巴无免疫沉淀反应，说明雄性体内不含有卵黄蛋白。纯化所得的卵黄蛋白即为雌性特异性蛋白。

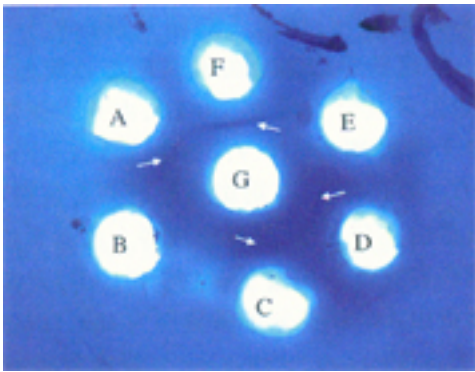


图 2 双向免疫扩散法检验红褐斑腿蝗卵黄蛋白

Fig. 2 Test of the vitellin existence in *Catantops pinguis* by double immunodiffusion

A, D：红褐斑腿蝗雌成虫血淋巴 Female hemolymph of *C. pinguis*；C, F：红褐斑腿蝗分离纯化的卵黄蛋白 Purified vitellin of *C. pinguis*；B, E：红褐斑腿蝗雄成虫血淋巴 Male hemolymph of *C. pinguis*；G：红褐斑腿蝗卵黄蛋白抗血清 Antiserum of *C. pinguis* vitellin. 图中白色箭头所示处为免疫沉淀线 White arrowheads show lines of immune deposition.

2.3 卵黄蛋白的定性分析

纯化后的样品经普通聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 后，分别用苏丹黑 B 和希夫试剂染色都呈阳性反应，说明卵黄蛋白是一种糖脂复合蛋白 (图 3：I，II)。

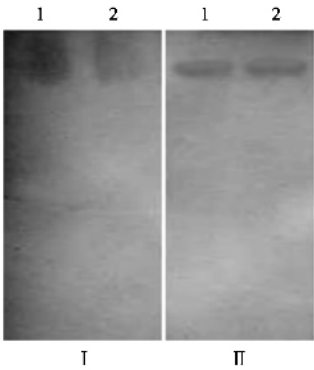


图 3 红褐斑腿蝗卵黄蛋白的定性分析

Fig. 3 Qualitative analysis of vitellin from *Catantops pinguis*. 经聚丙烯酰胺凝胶电泳后的希夫试剂染色 (I) 和苏丹黑 B 染色 (II). PAGE stained with Schiff (I) and Sudan black B (II). 1, 2：纯化的卵黄蛋白 Purified vitellin.

2.4 卵黄蛋白的分子量及其亚基组成

纯化后的样品经聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳，考马斯亮蓝 R250 染色后出现 1 条蛋白带即卵黄蛋白，根据标准蛋白，计算出红褐斑腿蝗卵黄蛋白的分子量为 548 kD (图 4)。该条带在雌成虫血淋巴中同样存在，但不存在于雄成虫血淋巴中 (图 4)，同样说明纯化所得的卵黄蛋白即为雌性特异性蛋白。

纯化的卵黄蛋白经 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝 R250 染色显示卵黄蛋白由 7 个亚基组成，各亚基

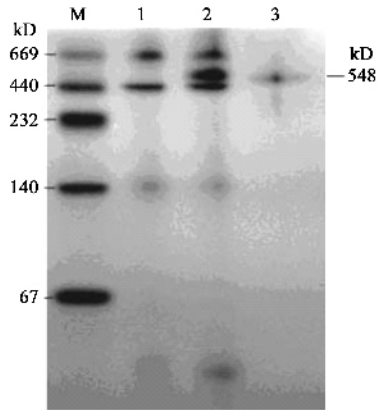


图 4 红褐斑腿蝗卵黄蛋白的分子量测定

Fig. 4 Determination of molecular weight of vitellin from *Catantops pinguis* by PAGE

M: 标准蛋白 Molecular weight marker ;

1: 雄成虫血淋巴 Male hemolymph ;

2: 雌成虫血淋巴 Female hemolymph ;

3: 纯化的卵黄蛋白 Purified vitellin.

分子量分别为 147.3,100.2,95.9,59.6,53.6,49.0 和 42.2 kD(图 5)。

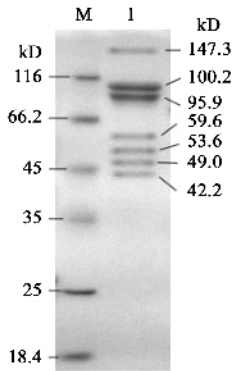


图 5 红褐斑腿蝗卵黄蛋白的还原性 SDS-PAGE 电泳示亚基组成

Fig. 5 The subunits of vitellin from *Catantops pinguis* by reductibility SDS-PAGE.

M: 标准蛋白 Molecular weight marker

1: 纯化的卵黄蛋白 Purified vitellin.

2.5 高效液相色谱分析

经高效液相色谱分析,红褐斑腿蝗卵黄蛋白的氨基酸组成及含量见表 1。红褐斑腿蝗卵黄蛋白中检测到 17 种最常见的氨基酸及 NH₃ 峰,其中谷氨酸(Glu)百分含量最高,达 13.46%,天冬氨酸(Asp)、亮氨酸(Leu)、半胱氨酸(Cys)、精氨酸(Arg)含量比较高,脯氨酸(Pro)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)含量较低。

表 1 红褐斑腿蝗卵黄蛋白氨基酸组成和含量(%)

Table 1 Amino acid composition and content of vitellin from <i>Catantops pinguis</i>			
氨基酸 Amino acid	百分含量 Percentage of amino acid (%)	氨基酸 Amino acid	百分含量 Percentage of amino acid (%)
苏氨酸 Thr	3.47	天冬氨酸 Asp	11.67
丝氨酸 Ser	6.59	谷氨酸 Glu	13.46
缬氨酸 Val	6.76	甘氨酸 Gly	2.53
蛋氨酸 Met	3.68	丙氨酸 Ala	6.08
异亮氨酸 Ile	5.51	酪氨酸 Tyr	2.52
亮氨酸 Leu	9.73	脯氨酸 Pro	2.09
苯丙氨酸 Phe	3.59	半胱氨酸 Cys	7.87
组氨酸 His	2.18	NH ₃	2.35
赖氨酸 Lys	2.41	色氨酸 Trp	—
精氨酸 Arg	7.51		

3 讨论

直翅目昆虫与大多数昆虫的 V_g 基因具有大(180 kD)、小(50 kD)两种亚基基因,V_g 为 400 ~ 600 kD 的糖脂蛋白,由大(120 ~ 200 kD)、小(40 ~ 60 kD)两类亚基单位组成(Harnish and White, 1982a, 1982b)。从本实验结果看,红褐斑腿蝗的卵黄蛋白符合上述结论,也是一种分子量为 548 kD 的糖脂复合蛋白,由 7 个亚基组成,各亚基间没有二硫键,亚基分子量分别为 147.3,100.2,95.9,59.6,53.6,49.0 和 42.2 kD,与 Izumi 等(1994)所报道的昆虫卵黄蛋白分子量在 210 ~ 652 kD 之间结论一致。

Chen 等(1978)报道飞蝗卵黄蛋白的分子量为 550 kD 陈建新等(2002)在研究东亚飞蝗的卵黄蛋白时,也发现其分子量为 550 kD,由 6 个亚基组成,亚基分子量分别为 126.9,115.9,103.4,85.5,79.1,71.4 kD。由此可见,红褐斑腿蝗的卵黄蛋白与飞蝗的卵黄蛋白在分子量、亚基组成等方面非常接近,但比家蟋蟀卵黄蛋白的分子量(约 402 kD)要高,家蟋蟀卵黄蛋白 4 个亚基分子量分别为 182,117,52.5 和 50 kD(Handley *et al.*, 1998)。与蜚蠊目昆虫相比,红褐斑腿蝗的卵黄蛋白分子量(548 kD)低于德国小蠊 *Blatella germanica* 的分子量(652 kD)(于长明等, 1998),但高于马德拉蜚蠊 *Leucophaea maderae* 的分子量(359 kD)(Tufail and Takeda,2002),且都有大、小两类亚基单位组成。

经高效液相色谱分析表明,红褐斑腿蝗卵黄蛋白中检测到 17 种最常见的氨基酸及 NH₃ 峰,这与其他昆虫的卵黄蛋白氨基酸组分相似。红褐斑腿蝗卵黄蛋白的谷氨酸 Glu、天冬氨酸 Asp、亮氨酸(Leu)、

精氨酸(Arg)含量比较高,组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)含量较低,与飞蝗卵黄蛋白的结果十分相似(Glinka and Triseleva, 1989),但含硫氨酸如蛋氨酸,特别是半胱氨酸的含量较飞蝗等其他昆虫显著要高(Kunke *et al.*, 1976; Irie and Yamashita, 1983; 龚和等, 1982; 陶淑霞, 2004; 李恺等, 2007)。有关卵黄原蛋白在脂肪体如何合成并转移到卵巢细胞被内吞后沉积为卵黄蛋白,还有待于进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

- Byrne BM, Gruber M, Ab G, 1989. The evolution of egg yolk proteins. *Pro. Biophys. Mol. Biol.*, 53(1): 33–69.
- Chang HC, Bradley JT, 1983. Vitellogenin synthesis and secretion in ovariectomized crickets. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 75(4): 733–737.
- Chen JX, Shen J, Song GL, Zhang L, Yan YH, 2002. Effect of *Nosema locustae* on the content of vitellogenin of *Locusta migratoria manilensi*. *Acta Entomol. Sin.*, 45(2): 170–174. [陈建新, 沈杰, 宋郭伦, 张龙, 严毓华, 2002. 蝗虫微孢子虫对东亚飞蝗卵黄原蛋白含量的影响. *昆虫学报*, 45(2): 170–174]
- Chen TT, Hillen LJ, 1987. Expression of insect vitellogenin gene. In: Fu YL ed. *Advance in Insect Physiology* (4). Science Press, Beijing. 137–151. [Chen TT, Hillen LJ, 1987. 昆虫卵黄原蛋白基因的表达. 见: 傅贻玲 主编. *昆虫生理学研究进展* (第四辑). 北京: 科学出版社. 137–151]
- Chen TT, Strahlendorf P, Wyatt GR, 1978. Vitellin and vitellogenin from locusts (*Locusta migratoria*): properties and post-translational modification in the fat body. *J. Biol. Chem.*, 253(15): 5 325–5 331.
- Chinzei Y, Chino H, Wyatt GR, 1981. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, 11(1): 1–7.
- Dai HG, Yi WX, 2006. Separation and characterization of vitellin of *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hymenoptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 49(1): 29–33. [戴华国, 衣维贤, 2006. 褐飞虱卵黄蛋白的分离及其生化性质. *昆虫学报*, 49(1): 29–33]
- Dong SZ, Ye GY, Zhu JY, Chen ZX, Hu C, Liu SS, 2007. Vitellin of *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae), a pupal endoparasitoid of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae): biochemical characterization, temporal patterns of production and degradation. *J. Insect Physiol.*, 53(5): 468–477.
- Falchuk KH, Montorzi M, 2001. Zinc physiology and biochemistry in oocytes and embryos. *Biometals*, 14(3–4): 385–395.
- Glinka AV, Triseleva TA, 1989. Differential regulation of protein biosynthesis at translational level in the fat body cells of adult *Locusta migratoria*. *Mol. Reprod. Dev.*, 1(4): 278–282.
- Gong H, Li QJ, 1992. Vitellogenesis and its hormonal regulation in the domestic fly, *Musca domestica*. *Acta Entomol. Sin.*, 35(2): 129–137. [龚和, 李乾君, 1992. 家蝇的卵黄发生及其激素调节. *昆虫学报*, 35(2): 129–137]
- Gong H, Zhang JZ, Zhai QH, 1982. Characterization of the vitellin in *Coccinella septempunctata* L. *Acta Entomol. Sin.*, 25(1): 9–15.
- [龚和, 张建中, 翟启慧, 1982. 七星瓢虫卵黄蛋白的理化性质. *昆虫学报*, 25(1): 9–15]
- Hagedorn HH, Kunkel JG, 1979. Vitellogenin and vitellin in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 24: 475–505.
- Hagedorn HH, Maddison DR, Tu Z, 1998. The evolution of vitellogenins, cyclorhaphan yolk proteins and related molecules. *Adv. Insect Physiol.*, 27: 235–284.
- Handley HL, Estridge BH, Bradley JT, 1998. Vitellin processing and protein synthesis during cricket embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(11): 875–885.
- Hamish DG, White BN, 1982a. An evolutionary model for the insect vitellins. *J. Mol. Evol.*, 18(6): 405–413.
- Hamish DG, White BN, 1982b. Insect vitellins: Identification, purification and characterization from eight orders. *Exp. Zool.*, 220(1): 1–10.
- He ZX, Zhang SZ, 1999. Electrophoresis. 2nd ed. Science Press, Beijing. 361 pp. [何忠效, 张树政, 1999. 电泳(第二版). 北京: 科学出版社, 361 页.]
- Hinks CF, Cheeseman MT, Erlandson MA, Olfert O, Westcott ND, 1991. The effects of kochia, wheat and oats on digestive proteinases and the protein economy of adult grasshoppers, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Insect Physiol.*, 37(6): 417–423.
- Injeyan HS, Tobe SS, 1981a. Phase polymorphism in *Schistocerca gregaria*: Reproductive parameters. *J. Insect Physiol.*, 27(2): 97–102.
- Injeyan HS, Tobe SS, 1981b. Phase polymorphism in *Schistocerca gregaria*: Assessment of juvenile hormone synthesis in relation to vitellogenesis. *J. Insect Physiol.*, 27(3): 203–210.
- Irie K, Yamashita O, 1983. Egg-specific protein in the silkworm *Bombyx mori*: purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis. *Insect Biochem.*, 13(1): 71–80.
- Izumi S, Yano K, Yamamoto Y, Takahashi SY, 1994. Yolk proteins from insect eggs: structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. *J. Insect Physiol.*, 40(9): 735–746.
- Kidokoro K, Iwata K, Fujiwara Y, Takeda M, 2006. Effects of juvenile hormone analogs and 20-hydroxyecdysone on diapause termination in eggs of *Locusta migratoria* and *Oxya yezoensis*. *J. Insect Physiol.*, 52(5): 473–479.
- Kunkel JG, Pan ML, 1976. Selectivity of yolk protein uptake: Comparison of vitellogenins of two insects. *J. Insect Physiol.*, 22(6): 809–818.
- Kunkel JG, Nordin JH, 1985. Yolk protein. In: Kerkul GA, Gilbert LI eds. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, New York. 83–111.
- Li CW, 1992. *Immunochemistry Techniques*. Shanghai Scientific and Technical Press, Shanghai. 182–190, 235–238. [李成文, 1992. 现代免疫化学技术. 上海: 上海科学出版社. 182–190, 235–238]
- Li K, Zhang TS, Zhang LL, Wang B, Wang Q, 2007. Molecular characterization and dynamic analysis on vitellin of *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae). *Acta Entomol. Sin.*, 50(10): 975–980. [李恺, 张天澍, 张丽莉, 王斌, 王群, 2007. 龟纹瓢虫卵黄蛋白的分子特性及发生动态. *昆虫学报*, 50(10):

975 – 980]

- Mang KQ, Xu NZ, Fang RX, 1975. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Science Press, Beijing. 58 – 59. [莽克强, 徐乃正, 方荣祥, 1975. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社. 58 – 59]
- Minakuchi C, Riddiford LM, 2006. Insect juvenile hormone action as a potential target of pest management. *J. Pestic. Sci.*, 31 (2): 77 – 84.
- Petavy G, 1985. Origin and development of the vitellogophages during embryogenesis of the migratory locust *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acrididae). *Inter. J. Insect Morphol. Embryol.*, 14 (1): 361 – 379.
- Petavy G, 1986. Contribution of the vitellogophages to yolk digestion and cytophagocytosis during embryogenesis of the migratory locust *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acrididae). *Inter. J. Insect Morphol. Embryol.*, 15 (1): 343 – 361.
- Raikhel AS, Dhadialla TS, 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 217 – 251.
- Reid PC, Chen TT, 1981. Juvenile hormone-controlled vitellogenin synthesis in the fat body of the locust (*Locusta migratoria*): Isolation and characterization of vitellogenin polysomes and their induction *in vivo*. *Insect Biochem.*, 11 (3): 297 – 305.
- Sappington TW, Raikhel AS, 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28 (5 – 6): 277 – 300.
- Swevers L, Raikhel AS, Sappington TW, Shirk P, Latrou K, 2005. Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In: Gilbert LI, Latrou K, Gill SS eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier Ltd, Oxford. 87 – 155.
- Tao SX, 2004. Studies on Vitellin and Vitellogenesis of *Chrysopa septempunctata* Wesmael. PhD dissertation, Northeast Forestry University, Harbin. 25 – 31. [陶淑霞, 2004. 大草蛉卵黄蛋白及卵黄发生的研究. 哈尔滨: 东北林业大学博士论文. 25 – 31]
- Tufail M, Takeda M, 2002. Vitellogenin of the cockroach, *Leucophaea maderae*: nucleotide sequence, structure and analysis of processing in the fat body and oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32 (11): 1 469 – 1 476.
- Wang SG, Ablikim G, 2006. Seasonal changes in the cold tolerance of grasshoppers, *Catantops pinguis* (Stål). *Chin. J. Appl. Ecol.*, 17 (6): 1 133 – 1 136. [王世贵, 阿布里克木·古丽米热, 2006. 红褐斑腿蝗的耐寒能力及其季节性变化. 应用生态学报, 17 (6): 1 133 – 1 136]
- Wyatt GR, 1990. Development and juvenile hormone control of gene expression in locust fat body. In: Hageaorn HH, Hildebrand JG, Kidwell MG, Law JH eds. *Molecular Insect Science*. Plenum Press, New York. 163 – 172.
- Ye GY, Hu C, Gong H, 1998. Physicochemical property of vitellogenin and vitellin of wild silkworm, *Anteraea yamamai*. *Science of Sericulture*, 24 (4): 248 – 249. [叶恭银, 胡萃, 龚和, 1998. 天蚕卵黄蛋白的主要理化性质. 蚕业科学, 24 (4): 248 – 249]
- Yu CM, Li CW, Liu Q, 1998. Development of a enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measurment of vitellin content in *Blatella germanica*. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 5 (4): 246 – 252 [于长明, 李成文, 刘泉, 1998. ELISA 测定德国小蠊卵黄蛋白含量方法的建立. 寄生虫与医学昆虫学报, 1 (3): 246 – 252]

(责任编辑: 黄玲巧)